广西夹竹桃内生真菌的多样性和抑制几种水产病原菌活性筛选

宋静静 [1]，罗美苗 [1]，李露 [1]，杨子聪 [1]，王琳 [1]，诸葛才智 [1]，邱清华 [2]，朱开昕 [3]，苏本伟 [3]，龚斌[1*]

(1. 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室，北部湾大学 海洋学院，广西 钦州 535011；2. 北部湾大学 陶瓷与设计学院，广西 钦州 535011；3. 广西钦州市中医医院，广西 钦州 535099)

摘要：夹竹桃是一种重要的药用植物。为研究夹竹桃内生真菌的多样性并评价其次生代谢产物的活性，该研究对广西夹竹桃（*Nerium indicum*）的内生真菌进行分离纯化，采用形态学和 ITS 序列分析结合的方法进行鉴定，以 5 种指示菌（其中有 3 种弧菌）对内生真菌提取物进行抑菌活性筛选。结果表明：（1）从广西夹竹桃共得到 19 株内生真菌，这 19 株内生真菌都属于子囊菌门，涵盖 5 个目 7 个属，包括炭疽菌属（*Colletotrichum*）、球座菌属（*Guignardia*）、叶点霉属（*Phyllosticta*）、新壳梭孢属（*Neofusicoccum*）、曲霉属（*Aspergillus*）、隔孢壳科新属（*Nothophoma*）和间座壳属（*Diaporthe*），优势属为炭疽菌属（分离率为 36.85%）和球座菌属（分离率为 21.05%），其中炭疽菌属主要分布于茎，球座菌属全部来源于叶；（2）抑菌试验表明 jing-117（*Neofusicoccum* sp.）和 ye-130（*Guignardia* sp.）对坎氏弧菌有较为特异的抑菌效果，ye-136（*Aspergillus* sp.）能够同时抑制蜡样芽孢杆菌和坎氏弧菌，ye-135（*Aspergillus* sp.）和 jing-116（*Colletotrichum* sp.）仅能够抑制蜡样芽孢杆菌，ye-134（*Guignardia* sp.）对溶藻弧菌有抑制作用。该研究首次基于 ITS 序列揭示了广西夹竹桃内生真菌存在较为丰富的多样性，并筛选到一些有抑菌活性的菌株，其提取物可以抑制水产病原弧菌的生长，具有较好的开发潜力。

关键词 ：夹竹桃，内生真菌，ITS 序列分析，弧菌，抑菌活性

Diversity of endophytic fungi isolated from *Nerium indicum* in Guangxi and activity screening of inhibiting several aquatic pathogens

SONG Jingjing[1], LUO Meimiao[1], LI Lu[1], YANG Zicong[1], WANG Lin[1], ZHUGE Caizhi[1], QIU Qinghua[2], ZHU Kaixin[3], SU Benwei[3], GONG Bin[1*]

(1. *Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, College of Marine Sciences, Beibu Gulf University,* Qinzhou 535011, China; 2. *College of Ceramies and Design, Beibu Gulf University,* Qinzhou 535011, China; 3. *Qinzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine,* Qinzhou 535099, China)

Abstract: *Nerium indicum* is an important medicinal plant. In order to study the diversity of endophytic

基金项目：国家自然科学基金资助项目（31560727）；广西自然科学基金资助项目（2018JJA130187; 2020GXNSFDA238015）；广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室（北部湾大学）自主基金（2021ZA01; 2019ZC01）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31560727); Natural Science Foundation of Guangxi (2018JJA130187; 2020GXNSFDA238015); Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation (Beibu Gulf University) (2021ZA01; 2019ZC01)]。

作者简介：宋静静（1981-），讲师，主要从事病源微生物研究，（E-mail） 31583504@qq.com。

***通信作者**：龚斌，教授，主要从事微生物资源和生态学研究，（E-mail） 342965691@aliyun.com。

fungi from *N. indicum* and evaluate the activity of its secondary metabolites, the endophytic fungi of *N. indicum* in Guangxi were isolated and purified, and identified by a combination of morphology and ITS sequence analysis. Then the antibacterial activity of endophytic fungus extracts were screened with 5 indicator bacteria (including 3 *Vibrio* species). The results showed that: (1) A total of 19 endophytic fungi were obtained from Guangxi *N. indicum*. The ITS sequence analysis showed that these 19 endophytic fungi all belonged to the Ascomycota, and covered 5 orders and 7 genera, which including *Colletotrichum, Guignardia, Phyllosticta, Neofusicoccum, Aspergillus, Nothophoma* and *Diaporthe*. Among them, the dominant genera were *Colletotrichum* (the separation rate was 36.85%) and *Guignardia*(the isolation rate was 21.05%). The *Colletotrichum* was mainly distributed on stems, and *Guignardia* all originated from leaves. (2) Antibacterial experiments showed that: jing-117 (*Neofusicoccum* sp.) and ye-130 (*Guignardia* sp.) had specific antibacterial effects on *Vibrio campbellii*. ye-136 (*Aspergillus* sp.) can simultaneously inhibited *Bacillus subtilis* and *Vibrio campbellii*. ye-135 (*Aspergillus* sp.) and jing-116 (*Colletotrichum* sp.) can only inhibited *Bacillus subtilis*. ye-134 (*Guignardia* sp.) had an inhibitory activity to *Vibrio alginolyticus*. The study revealed for the first time that endophytic fungi of *Nerium indicum* in Guangxi has a relatively rich diversity based on the ITS sequence. Some antibacterial active strains could be screened, and their extracts could inhibit the growth of aquatic pathogen *Vibrio*, which will has good development value in the future.

Keywords: *Nerium indicum*, endophytic fungi, analysis of ITS sequence, *Vibrio*, antibacterial activity

夹竹桃是夹竹桃科夹竹桃属的一种传统药用植物。夹竹桃属包含夹竹桃（*Nerium indicum*）和欧洲夹竹桃（*N. oleander*）两个种，夹竹桃种又包含白花夹竹桃（*Nerium indicum* Mill. cv. Paihua）一个变种，这些种在药用价值上区别较小。夹竹桃中存在着非常丰富的活性化合物，在世界各地（特别是印度和中国）都有广泛的应用。在传统中医中，被用于治疗心脏疾病、糖尿病、哮喘、癌症和癫痫等疾病(Elliott, 2002)。近代药理活性研究表明，夹竹桃含有抗细菌（Hussain &Gorsi, 2004）、抗真菌（Hadizadeh et al., 2009）、抗病毒（Singh et al., 2013）、抗氧化（Dey et al., 2012）、抗疟疾（Sharma et al., 2005）等多种活性成分。

内生真菌是植物微生态系统的重要组成部分，广泛存在于植物的健康组织中。内生真菌及其次生代谢产物在药理学和农业中有着广泛的应用(Alurappa et al., 2014)。从在紫杉的内生真菌*Taxomyces andreanae*中发现的抗癌化合物紫杉醇(Stierle et al., 1995)开始，目前已从植物内生真菌分离出多个抗病毒、抗肿瘤、抗微生物活性化合物，仅就抗微生物活性而言，就已经发现了Altersolanol A、Enfumafungin、Colletotric acid、Jesterone、Hydroxy-jesterone、Guignardic acid、Pestacin、Isopestacin等几十种活性化合物（Gupta et al., 2020），内生真菌可能在药用植物活性物质的合成中有重要作用。国内外研究表明，虽然目前有少量从夹竹桃中得到内生菌及其活性物质的报道（Huang et al., 2007，2008; Vallabhbhai, 2008; Ma et al., 2017a, b; Ren et al., 2016; 郑浩等, 2020; 朱美林等, 2020; Ramesha et al., 2013），但其对真菌的鉴定主要基于形态学特征。但由于植物内生真菌很多不产孢，仅依靠形态学数据不能准确反应夹竹桃内生真菌种类；而采用分子系统的方法对夹竹桃内生真菌多样性进行研究还未有报道。另一方面，目前研究发现的夹竹桃内生真菌及其活性物质的类型主要包括抗肿瘤、抗氧化、杀虫、抗植物病原真菌、抗人体的病原菌等，而在抗水产病菌方面鲜有报道。

广西地处亚热带地区，良好的环境孕育了很多药用价值高的道地药材，该区域药用植物内生菌多样性的研究可以为将来系统评估和回答"药材药效的地域差异"提供参考。夹竹桃作为一种全世界广泛分布的药用植物，开展本研究一方面可以回答夹竹桃内生真菌多样性究竟如何？有哪些内生真菌类型？其在不同组织的分布如何？另一方面，目前水产养殖中抗生素的使用受到了严格的限制，而新的水产病原菌及抗生素多耐药菌不断出现。夹竹桃内生真菌作为发掘天然活性化合物的重要资源，从中能否获得抑制水产病原菌的新型抗菌活性菌株和化合物？本研究拟对广西钦州市夹竹桃中

的内生真菌进行分离鉴定和抗菌活性筛选，以期能够获得一些具有抗水产病原弧菌活性的菌株，为进一步开发新型的抗菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集和预处理

夹竹桃样品采集于广西钦州市钦北区，经专家鉴定为夹竹桃属夹竹桃（*Nerium indicum*）。选取健康夹竹桃的新鲜茎段和叶组织块，用自来水冲洗表面的泥土和灰尘，在无菌操作台中进行表面消毒：先将样品浸泡在 75%酒精中 3～5 min，再转入 3%～5%的次氯酸钠溶液中浸泡 30 s，然后再用无菌水冲洗干净。在超净操作台中放到干燥灭菌的培养皿中晾干，备用。

1.2 内生真菌分离及纯化

将上述处理过的茎段和叶片组织用无菌剪刀剪成 5 mm×5 mm 小块后，贴于 PDA 培养基平板上。置于 28 ℃恒温培养箱倒置培养 2～4 d，并定期观察真菌的生长情况。得到生长状况良好的菌株。待组织边缘发现有菌丝长出时，在无菌环境下挑取菌丝尖端转接到纯化培养基平板上。经多次分离纯化后再接种于 PDA 斜面作为保种，保存在 4～8 ℃冰箱备用。

1.3 形态学鉴定

将分离菌株接种于 PDA 培养基平板中，放置于 28 ℃培养箱中培养。在各菌株生长的最佳时期，对照《真菌鉴定手册》(魏景超, 1997)，观察菌落形态（菌落颜色、大小、性状及边缘等）、生长情况、菌丝体、孢子的形态特征和表面特征，拍照记录。

1.4 DNA 提取

菌丝体用液氮研磨至匀浆状，再加入600 μL的CTAB提取液，65 ℃水浴45 min，12 000 r·min^{-1}离心5 min，取上清液；加入苯酚：氯仿：异戊醇混合液（25：24：1），混匀后4 ℃条件下，10 000 r·min^{-1}离心5 min；取上清液，加入-20 ℃预冷的异戊醇静置数分钟；室温12 000 r·min^{-1}离心5 min，去上清液；取沉淀，用75%乙醇洗沉淀，加50 μL无菌水，-20 ℃保存备用。

1.5 ITS rDNA 序列分析

提取内生真菌的 DNA 后，用真菌鉴定通用引物 ITS1 （5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）和 ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′） 扩增真菌 ITS rDNA 序列。PCR 反应体系：ddH$_2$O 20 μL，2×Taq PCR MasterMix 25 μL (北京索莱宝生物科技有限公司)，10 μmol·L^{-1} 的引物各 2 μL，10 ng·μL^{-1} 模板 1 μL。反应程序：94 ℃预变性 4 min，94 ℃变性 30 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，30 个循环，72 ℃延伸 10 min。引物合成和测序都由北京六合华大基因科技有限公司完成。将获得的序列用 Blast 程序在 GenBank 数据库中进行同源性检索，比对得出与其相似性最高的核酸序列。通过 MEGA7.0 软件使用邻接法构建系统发育树。

1.6 内生真菌次生代谢产物的提取和抑菌活性的测定

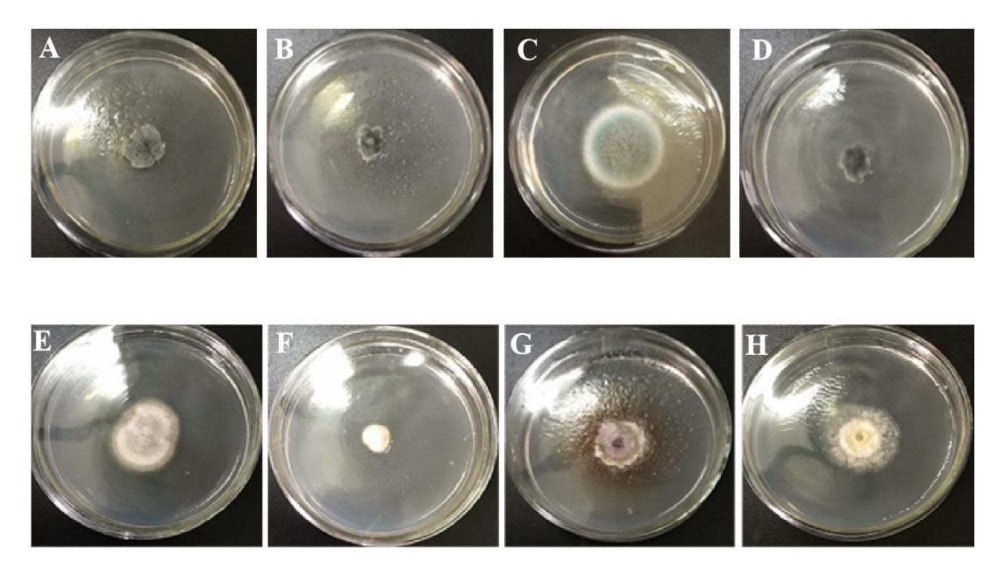
接种分离真菌于 100 mL 液体 PDA 培养基，于 26~28 ℃在 200 r·min^{-1} 转速下培养 10～20 d 至菌丝体长满三角瓶。8 000 r·min^{-1} 离心收集菌丝体，20 ℃下吹干水分。称取 0.3 g 干燥后的菌体加入 5 mL 提取液（乙酸乙酯：甲醇：乙酸=80：15：5）浸泡，然后将提取液静置挥发，加入 500 uL 乙酸乙酯溶解提取物。抑菌活性指示菌蜡样芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 、魔鬼弧菌(*Vibrio diabolicus*)由本实验室购买保藏；溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、坎氏弧菌（*Vibrio campbellii*）分离自患病的鱼虾。分别接种到 LB 液体培养基中，

30～35 ℃摇床上以 200 r·min^{-1} 的转速培养过夜。将上述菌液 200 uL 采用混菌法接种于培养皿中，采用滤纸片法测定抑菌活性，观察抑菌圈的有无及大小，测量并记录抑菌圈直径(Gong et al., 2018)。该试验使用滤纸片蘸取乙酸乙酯作为空白对照，阳性对照为滤纸片蘸取 50 ug·mL^{-1} 的卡那霉素和氯霉素。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的形态学鉴定

从夹竹桃的茎段、叶片表面中共分离纯化到 19 株内生真菌，部分菌落形态如图 1 所示。根据菌株的菌落、菌丝体和孢子的形态特征，对照《真菌签定手册》进行初步鉴定，分属于 7 个属。其中叶部组织获得 12 株菌，占 63.16%，分属于炭疽菌属（*Colletotrichum* spp.）、球座菌属（*Guignardia* spp.）、叶点霉属（*Phyllosticta* spp.）、新壳梭孢属（*Neofusicoccum* sp.）和曲霉属（*Aspergillus* spp.）；茎部分离到 7 株菌，分别属于：炭疽菌属、隔孢壳科新属（*Nothophoma* sp.）和间座壳属（*Diaporthe* sp.），占分离总量的 36.84%(表 1)，表明了夹竹桃的内生真菌在茎段、叶片组织中广泛分布。



A. 菌株 ye-130; **B.** 菌株 ye-134; **C**. 菌株 ye-135; **D**. 菌株 ye-136; **E**. 菌株 jing-116; **F**. 菌株 jing-117; G. 菌株 jing-119; **H**. 菌株 jing-180。

A. Strain ye-130; **B**. Strain ye-134; **C**. Strain ye-135; **D**. Strain ye-136; **E**. Strain jing-116; **F**. Strain jing-117; G. Strain jing-119; **H**. Strain jing-180.

图 1 夹竹桃部分内生真菌的典型菌落

Fig.1 Colony morphology of some endophytic fungi isolated from *Nerium indicum*

表 1 夹竹桃不同组织中内生真菌属的组成

Table 1 Composition of endophytic fungi in different tissues of *Nerium indicum*

来源组织 Tissue	分类 Taxa	数量 Number	分离率 CF（%）	总的分离率 Total CF（%）
叶	炭疽菌属 *Colletotrichum* spp.	2	10.53	63.16
Leaf	球座菌属 *Guignardia* spp.	4	21.05	
	叶点霉属 *Phyllosticta* spp.	3	15.79	
	新壳梭孢属 *Neofusicoccum* sp.	1	5.26	
	曲霉属 *Aspergillus* spp.	2	10.53	
茎	炭疽菌属 *Colletotrichum* spp.	5	26.32	36.84

Stem	隔孢壳科新属 *Nothophoma* sp.	1	5.26
	间座壳属 *Diaporthe* sp.	1	5.26

2.2 夹竹桃内生真菌的分子生物学鉴定

通过对得到的 19 株内生真菌的 DNA 进行 PCR 扩增和 ITS 测序，并进行 Blastn 分析，结果表明这 19 株内生真菌都属于子囊菌门，涵盖 5 个目 7 个属，且 ITS 序列和 GenBank 相似性都在 98%以上(表 2)。

基于 ITS 序列用 MEGA 7 软件构建系统进化树(图 2)，显示有 6 个分支，其中 ye-127、ye-129、ye-130、ye-131、ye-132、ye-133 和 ye-134 都属于葡萄座腔菌目（*Botryosphaeriales*），与 *Guignardia alliacea*、*Guignardia musicola*、*Phyllosticta fallopiae* 构成一个分支；jing-114、jing-115、jing-116、jing-118、jing-179、ye-126、ye-128 都属于小丛壳目（*Glomerellales*），与 *Colletotrichum fructicola* 和 *Colletotrichum citri-maximae* 构成一个分支；jing-117 与 *Neofusicoccum parvum* 构成一个分支；jing-180 属于间座壳目（*Diaporthales*），和 *Diaporthe* sp.构成一个分支，其亲缘关系比较近。ye-135、ye136 和 jing-119 共同构成一个大的分支，其中 jing-119 与 *Nothophoma anigozanthi* 亲缘关系较近。ye-135、ye136 都属于 *Aspergillus*，其中 ye-135 与 *Aspergillus neoellipticus* 亲缘关系较近，而 ye136 与 *Aspergillus tamarii* 亲缘关系较近。

表 2 夹竹桃内生菌 ITS 序列 Blastn 分析

Table 2 Blastn analysis of ITS sequence of *Nerium indicum*

菌编号 Code	Blastn 分析的相似性最高的类型 Reference accessionby Blastn	分类号 Accession No.	最高相似性 Maximum identity (%)
ye-126	*Colletotrichum fructicola*	NR144783	99.80
ye-127	*Guignardia musicola*	NR137716	100.00
ye-128	*Colletotrichum fructicola*	NR144783	100.00
ye-129	*Phyllosticta capitalensis*	NR144914	100.00
ye-130	*Guignardia musicola*	NR137716	99.84
ye-131	*G. alliacea*	AB454263	100.00
ye-132	*Phyllosticta capitalensis*	NR144914	99.82
ye-133	*P. capitalensis*	NR144914	99.82
ye-134	*Guignardia alliacea*	AB454263	100.00
ye-135	*Aspergillus neoellipticus*	AB250395	99.08
ye-136	*A. tamarii*	MH854614	99.82
jing-114	*Colletotrichum fructicola*	NR144783	100.00
jing-115	*C. fructicola*	NR144783	99.61
jing-116	*C. citri-maximae*	NR160823	99.63
jing-117	*Neofusicoccum parvum*	NR119487	99.42
jing-118	*Colletotrichum fructicola*	NR144783	100.00

jing-119	*Nothophoma anigozanthi*	NR135992	98.54
jing-179	*Colletotrichum fructicola*	NR144783	100.00
jing-180	*Diaporthe* sp.	KU557563	98.12

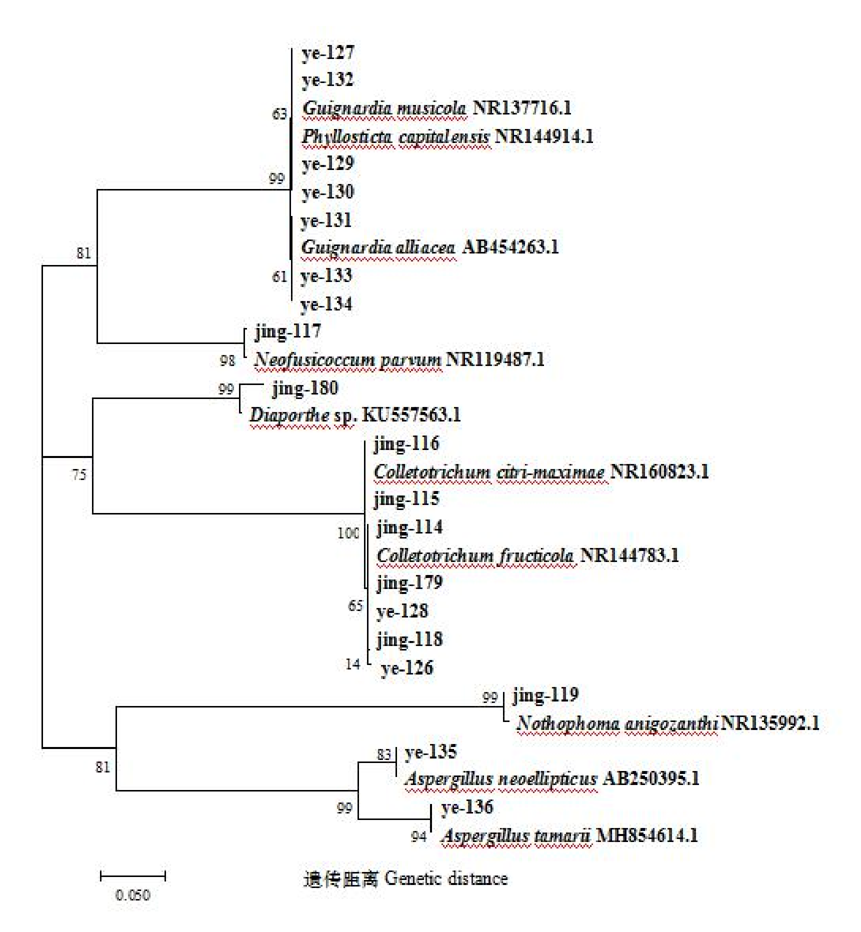


图 2 NJ 法构建的夹竹桃内生真菌 ITS 序列系统进化树图

Fig. 2 Phylogenetic tree of ITS rDNA sequences of endophytic fungi of *Nerium indicum* by NJ method

2.3 内生真菌在夹竹桃组织中的分布

分离获得的内生真菌菌株中，优势属为球座菌属和炭疽菌属，其中炭疽菌属为 7 株，分离率为 36.85%，主要分布于茎段中；球座菌属分离到 4 株菌，分离率为 21.05%，全部来源于叶组织；叶点霉属分离到 3 株菌，分离率为 15.79%，曲霉属分离到 2 株菌，分离率为 10.53%，全部来源于叶组织。另从叶片中分离到 1 株新壳梭孢属真菌，从茎段中分离到隔孢壳科新属、间座菌属真菌各 1 株(表 3)。

表 3 夹竹桃内生真菌在组织中的分布情况

Table 3 Distribution of the endophytic fungi in *Nerium indicum*

编号 No.	属 Genus	种 Species	叶 Leaf	茎 Stem
1	炭疽菌属	*Colletotrichum fructicola*	2	4
S5	*Colletotrichum*	*C. citri-maximae*		1
2	球座菌属	*Guignardia musicola*	2	
	Guignardia	*G. alliacea*	2	

3	叶点霉属 *Phyllosticta*	*Phyllosticta capitalensis*	3	
4	新壳梭孢属 *Neofusicoccum*	*Neofusicoccum parvum*	1	
5	隔孢壳科新属 *Nothophoma*	*Nothophoma anigozanthi*		1
6	间座壳属 *Diaporthe*	*Diaporthe* sp.		1
7	曲霉属 *Aspergillus*	*Aspergillus neoellipticus*	1	
		A. tamarii	1	

2.4 内生真菌抑菌活性的分析

挑选分离到的代表菌株进行液体发酵培养。将菌丝体和发酵液在干燥箱中干燥后用浸提液进行浸提。采用浸提物对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、溶藻弧菌、坎氏弧菌和魔鬼弧菌进行抑菌活性检测。结果显示，jing-116、ye-135、ye-136 对芽孢杆菌有较强的抑制效果，其中 jing-116、ye-135 的抑菌圈分别为 7.98 mm 和 9.29 mm，ye-136 更是高达 15.36 mm。ye-134 对溶藻弧菌有抑制效果，抑菌圈为 6.65 mm；jing-117、ye-130、ye-136 对坎氏弧菌有抑制效果，抑菌圈分别为：8.28 mm、8.33 mm 和 9.74 mm。抑菌试验结果表明，具有抑菌活性的内生真菌在夹竹桃的不同组织中均有分布，其中叶片中内生真菌的抑菌活性略高于茎段。

表 4 分离出的内生真菌的抑菌活性

Table 4 The antibacterial activity of the isolated endophytic fungi

菌株名称 Strain name	蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus*	坎氏弧菌 *Vibrio campbellii*	魔鬼弧菌 *Vibrio diabolicus*
jing-116	＋	－	－	－	－
jing-117	－	－	－	＋＋	－
ye-130	－	－	－	＋＋	－
ye-134	－	－	＋	－	－
ye-135	＋＋	－	－	－	－
ye-136	＋＋	－	－	＋＋	－
空白对照	－	－	－	－	－
阳性对照	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋

注: ＋＋表示 8.0 mm<抑菌圈直径; ＋表示 0.0 mm<抑菌圈直径<8.0 mm; －表示无抑菌作用; 滤纸片直径为 6.0 mm。

Note: ＋＋ indictes 8.0 mm < diameter of inhibition zone; ＋indictes 0.0 mm< diameter of inhibition zone <8.0 mm; － indicates no antibacterial activity; Diameter of filter paper was 6.0 mm.

3 讨论与结论

本研究从夹竹桃的叶和茎中分离到19株内生真菌，采用形态学结合ITS序列分析表明其分属于7个属，优势属包括炭疽菌属、球座菌属、叶点霉属，其他还包括新壳梭孢属、曲霉属、隔孢壳科新属、间座壳属等。炭疽菌属在其他学者对夹竹桃内生真菌的研究中也被分离到（Huang et al., 2007；Ramesha et al., 2013），而其他6个属在以往的夹竹桃内生真菌的研究中较少被提及，这可能是因为球座菌属、叶点霉属、新壳梭孢属、曲霉属、隔孢壳科和间座壳属较少产孢，依靠形态学的鉴定方法较难将这些真菌进行准确鉴定。例如，Huang从夹竹桃中分离到42株内生真菌，分属于14个类群，依靠形态能够确认的仅包括炭疽菌属、毛壳菌属和枝孢霉属（Huang et al., 2007）；而印度学者Ramesha从夹竹桃中分离到28株内生真菌，也仅描述出镰刀菌(*Fusium semitectum* NOF-3)、交链孢

菌(*Alternaria* NOF-7)、球孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* NOF-8)和菌丝霉菌(*Mycelia sterilia* NOS-6) 这些比较容易通过形态学进行鉴定的种属（Ramesha et al., 2013）。本研究利用形态学结合ITS序列分析相互结合的方法，准确鉴定出夹竹桃内生真菌的类型及其在不同组织的分布状况等，首次为夹竹桃内生真菌多样性的研究提供了准确的参考数据。

本研究分离得到 6 株活性菌株（jing-116、jing-117、ye-130、ye-134、ye-135、ye-136），其中大部分抗菌活性较强的内生真菌（如 ye-130、ye-134、ye-135 和 ye-136）来源于夹竹桃的叶，而夹竹桃的强心甙、三萜皂甙等活性成分也主要分布在叶中，提示内生真菌的活性可能和宿主植物有关（Radu & Kqueen, 2002），从植物的药用部位分离内生真菌获得活性菌株的机会可能更大（Gouda et al., 2016）。另外，本研究分离到的球座菌属和炭疽菌属包含多株真菌，例如 ye-127、ye-129、ye-130、ye-132 的 ITS 序列相同，都属于球座菌属（*Guignardia*），但发现只有 ye-130 有抗菌活性；同理 jing-115 和 jing-116 的 ITS 序列相同，都属于炭疽菌属（*Colletotrichum*），但只有 jing-116 有抗菌活性，说明抗菌活性具有菌株特异性，与 Phongpaichit 等的研究结果一致（Phongpaichit et al., 2006）。提示在做夹竹桃内生真菌分离时，通过增加分离的真菌的数量，将有利于得到更多抗菌活性菌株。

本研究分离得到的抗细菌活性的内生真菌中，ye-134（球座菌属，*Guignardia* sp.）对溶藻弧菌有抑制作用，jing-117（新壳梭孢属，*Neofusicoccum* sp.）、ye-130（*Guignardia* sp.）和ye-136（曲霉属，*Aspergillus* sp.）对坎氏弧菌有抑制作用。坎氏弧菌（Dong et al., 2017）是最近几年新发现的病原弧菌，因此本研究展现了良好的应用前景。目前从曲霉属真菌中有发现鳗弧菌(Guo et al., 2016)、副溶血性弧菌（Zhu et al., 2018）、抗哈维氏弧菌（Guo et al., 2019）的活性物质，但还未从新壳梭孢属和球座菌属真菌中发现抗弧菌的真菌和活性物质。新壳梭孢菌是植物病原菌，目前包含大约50个种，从7个种的新壳梭孢菌中分离鉴定了9类化合物，包括环己烯酮、5，6-二氢-2-吡喃酮、麦托考酮、萘酮、萘醌、酚和醇、倍半萜等（Salvatore et al., 2021）。球座菌属真菌也曾经在其它植物内生真菌中发现有抗菌活性的报道(Gong et al., 2014)。在后续研究中，我们可以针对ye-134、ye-130和jing-117开展活性物质的研究，这有望获得一些新型的抗水产病菌的抗菌剂。

参考文献

ALURAPPA R, BOJEGOWDA M, KUMAR V, et al., 2014. Characterization and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L.[J]. Nat Prod Res, 28(23): 2217-2220.

GONG B, CHEN YP, ZHANG H, et al., 2014. Isolation, characterization and anti-multiple drug resistant (MDR) bacterial activity of endophytic fungi isolated from the mangrove plant, *Aegiceras corniculatum*[J]. Trop J Pharm Res, 13(4): 593-599.

DEY P, CHAUDHURI D, CHAUDHURI TK, et al., 2012. Comparative assessment of the antioxidant activity and free radical scavenging potential of different parts of *Nerium indicum*[J]. Int J Phytomedicine, 4: 54-69.

DONG X, WANG H, XIE, G, et al., 2017. An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the pir VP gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. Emerg Microbes Infect, 6(1): 1-3.

ELLIOTT J, 2002. Handbook of Medicinal Herbs [M]. State of Florida: CRC press:122.

GONG B, CHEN S, LAN W, et al., 2018. Antibacterial and antitumor potential of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei Sea of the southern coast of China[J]. Iran J Pharm Res, 17(4): 1339-1346.

GOUDA S, DAS G, SEN SK, et al., 2016. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance[J]. Front Microbiol, 7: 1538.

GUO L, WANG C, ZHU WC, et al., 2016. Bioassay-guided fractionation and identification of active

substances from the fungus *Aspergillus tubingensis* against *Vibrio anguillarum*[J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 30(3): 602-606.

GUO L, ZHANG F, WANG X, et al., 2019. Antibacterial activity and action mechanism of questin from marine *Aspergillus flavipes* HN4-13 against aquatic pathogen *Vibrio harveyi*[J]. Biotech, 9(1): 1-7.

GUPTA S, CHATURVEDI P, KULKARNI MG, et al., 2020. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi[J]. Biotechnol Adv, 39: 107462.

HADIZADEH I, PEIVASTEGAN B, KOLAHI M, 2009. Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L) extracts on plants pathogenic fungi[J]. Pak J Biol Sci, 12: 58-63.

HUSSAIN MA, GORSI MS, 2004. Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn[J]. Asian J Plant Sci, 3:177-80.

HUANG WY, CAI YZ, HYDE KD, et al., 2007. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) : main constituents and antioxidant activity[J]. World J Microbiol Biotechnol, 23:1253-1263.

HUANG WY, CAI YZ, HYDE KD, Corke H, et al., 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants[J]. Fungal Divers, 33:61-75.

MA YM, QIAO K, KONG Y, et al., 2017a. A new isoquinolone alkaloid from an endophytic fungus R22 of *Nerium indicum*[J]. Nat Prod Res, 31(8): 951-958.

MA YM, QIAO K, KONG Y, et al., 2017b. A new p-hydroxybenzoic acid derivative from an endophytic fungus *Penicillium* sp. of *Nerium indicum*[J]. J Asian Nat Prod Res, 19(12): 1245-1251.

PHONGPAICHIT S, RUNGJINDAMAI N, RUKACHAISIRIKUL V, et al., 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from Garcinia species[J]. FEMS Immuno Med Mic, 48(3): 367-372.

RADU S, KQUEEN CY, 2002. Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity[J]. Osteoporosis Int, 9(2): 23-33.

RAMESHA A, SUNITHA VH, SRINIVAS C, 2013. Antimicrobial activity of secondary metabolites from endophytic fungi isolated from *Nerium Oleander* L. [J]. Int J Pharm Biol Sci, 4(1): (B) 683-693.

REN N, LIU JJ, YANG DL, et al., 2016. Indentification of vincamine indole alkaloids producing endophytic fungi isolated from *Nerium indicum*, Apocynaceae[J]. Microbiol Res, 192: 114-121.

SALVATORE MM, ALVES A, ANDOLFI A, 2021. Secondary Metabolites Produced by Neofusicoccum Species Associated with Plants: A Review[J]. Agriculture, 11(2): 149-167.

SHARMA P, MOHAN L, SRIVASTAVA CN, 2005. Larvicidal potential of *Nerium indicum* and Thuja oriertelis extracts against malaria and Japanese encephalitis vector[J]. J Environ Biol, 26: 657-660.

SINGH S, SHENOY S, NEHETE PN, et al, 2013. *Nerium oleander* derived cardiac glycoside oleandrin is a novel inhibitor of HIV infectivity[J]. Fitoterapia, 84: 32-39.

STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D, et al., 1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific Yew, Taxus brevifolia[J]. J Nat Prod, 58(9): 1315-1324.

VALLABHBHAI KM, 2008. Isolation and biological screening of endophytic fungi from *Nerium Oleander* Linn. (Apocynaceae)[D]. Chennai: Chennai Medical University: 71-80.

WEI JC, 1979. Identificacion manual of fungi[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers: 179本研究魏景超, 1979. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社: 179.]

ZHENG H, MEI WL, CAI CH, et al., 2020. Study on the secondary metabolites and their bioactivities of the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. HK-08 from the leaves of *Nerium indicum*[J]. Nat Prod Res Dev, 32(1): 78-83. [郑浩, 梅文莉, 蔡彩虹, 等, 2020. 夹竹桃叶内生真菌 *Colletotrichum* sp. HK-08 的次生代谢产物及其活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 32(1): 78-83.]

ZHU ML, WANG HT, HUANG XN, et al., 2020. Isolation and screening of bioactive endophytic fungi from *Nerium oleander* and study on the secondary metabolites of *Aspergillus* sp 本研究 J]. J Shanxi Med Univ, 51(9): 982-985 本研究朱美林, 王皓天, 黄雪南, 等, 2020. 夹竹桃活性内生真菌的分离筛选及菌株 *Aspergillus* sp.次级代谢产物的研究[J]. 山西医科大学学报, 51(9): 982-985.]
ZHU A, ZHANG XW, ZHANG M, et al., 2018. Aspergixanthones I-K, new anti-*Vibrio* prenylxanthones from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. ZA-01[J]. Mar Drugs, 16(9): 312.